



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**CAMPUS DIADEMA**



**MAYRA MAYUMI SAKIYAMA**

**Importância da validação analítica e seus parâmetros**

**DIADEMA**

**2018**

MAYRA MAYUMI SAKIYAMA

## Importância da validação analítica e seus parâmetros

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia, ao Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – *campus* Diadema.

Orientador Prof. Dr. Fernando Luiz A. Fonseca

DIADEMA

2018

Sakiyama, Mayra Mayumi

**Validação e verificação de metodologia analítica: Revisão Sistemática** / Mayra Mayumi Sakiyama. -- Diadema, 2018.

23 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) –  
Universidade Federal de São Paulo – Campus Diadema, 2018.

Orientador: Fernando Luiz Affonso Fonseca

1. Validação analítica. 2. Verificação analítica. 3. Transferência analítica. I. Título.

CDD 615.1901

MAYRA MAYUMI SAKIYAMA

## Importância da validação analítica e seus parâmetros

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Farmácia, ao Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo – *campus* Diadema.

Aprovado em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Fernando Luiz Affonso Fonseca – UNIFESP Diadema

---

Prof. Dr. Edimar Cristiano Pereira - UNIFESP Diadema

---

Prof. Dr. Fabio Ferreira Perazzo - UNIFESP Diadema

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me oferecer saúde e muita força para superar minhas dificuldades, iluminando sempre meu caminho.

Agradecimento especial para meu orientador professor Fernando pela paciência, suporte, correções e incentivos que tornaram possível a conclusão desta monografia.

Agradeço também a todos os professores que me proporcionaram conhecimento e apoio ao longo da graduação.

Agradeço aos amigos, familiares e todas as pessoas que diretamente ou indiretamente influenciaram na minha formação profissional e pessoal.

## **Resumo**

O presente trabalho tem como objetivo propor parâmetros necessários de validação e verificação de métodos físico-químico qualitativo, semi-quantitativo e/ou quantitativo de acordo com legislações nacionais e internacionais. A validação e verificação são evidências documentadas de que um método cumpre apropriadamente sua finalidade, independente do ambiente em que está sendo executado; ressaltando a importância da qualidade e confiabilidade dos resultados como um dos recursos fundamentais para a proteção e promoção da saúde da população. O processo é documentado através de protocolo e relatório de validação e devem ser aprovados por uma agência regulatória, após aprovação o método é implementado na rotina do controle de qualidade.

**Palavras chaves:** Validação; Verificação; Analítica; Qualidade.

## **Abstract**

The present paper has as objective to propose the necessary parameters of validation and verification qualitative, semi-quantitative or quantitative analytical in accordance with national and international legislation. The validation and verification are documented evidence that a method complies properly your purpose, regardless of the ambient which that is being executed, emphasizing the importance of quality and reliability of the results as one of the fundamental resource for the protection and promotion of the health of the population. The process is documented through protocol and report validation and they must be approved by a regulatory agency, after approval the method is implemented in the quality control routine.

**Key words:** Validation; Verification; Analytical; Quality.

### **Lista de abreviaturas e siglas**

BPF – Boas Práticas de Fabricação

DPR - Desvio Padrão Relativo

ICH – International Conference on Harmonisation

IFA – Insumo Farmacêutico Ativo

LOD – Limit of Detection - Limite de Detecção

LOQ – Limit of Quantitation - Limite de Quantificação

SQR – Substancia Química de Referência

SQF - Substância Química de Referência Farmacopeica

SQC - Substancia Química de Referência Caracterizada

USP - United States Pharmacopeia – Farmacopéia Americana



## SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	09
2- OBJETIVOS.....	09
3- DESENVOLVIMENTO.....	10
4- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	21
REFERÊNCIAS.....	23

## 1) Introdução

A validação de método físico-químico é um componente essencial, no qual o laboratório deve implementar para produzir resultados analíticos de confiança. Validação de um método analítico é o processo pelo qual se estabelecem características necessárias para assegurar as exigências das aplicações analíticas, garantindo a confiabilidade dos resultados e atendendo as exigências regulatórias nacionais e internacionais; objetivando indicadores de que os procedimentos e instrumentos são adequados para o controle de qualidade.

A validação deve ser documentada através de um plano mestre de validação, protocolo e relatório. Estes podem ser utilizados para verificar planejamento e cronograma, referência de instalações, controle de mudanças e procedimentos, além da qualidade, confiabilidade e rastreabilidade dos resultados analíticos.

“Os estudos de validação são parte essencial das BPF (sic, BPF – Boas Práticas de Fabricação) e devem ser conduzidos de acordo com protocolos pré-definidos e aprovados. Relatório (...) contendo os resultados e conclusões devem ser preparados e arquivados.” (RDC nº 17/2010)

Devem proceder com a validação ou verificação de um método analítico quando:

- Desenvolvimento de uma nova substância e/ou método;
- Alteração de local de fabricação;
- Uma análise for acrescentada nos testes de liberação de um lote;
- Houver alteração de parâmetros, instrumentos e/ou reagentes do escopo original;
- Houver transferência analítica entre laboratórios.

## 2) Objetivos

Estabelecer os parâmetros nacionais e internacionais para validação e validação parcial de métodos físico-químicos, necessários em um sistema de

qualidade de um laboratório. Demonstrar os critérios de avaliação e cálculos necessários para obter um resultado confirmativo de uma validação.

### **3) Desenvolvimento**

Validação analítica é um processo definido como: “é a avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos” (RDC 166/2017).

Revalidação de método analítico é um processo definido como: “repetição parcial ou total da validação de um método analítico para assegurar que esse continua cumprindo com os requisitos estabelecidos” (RDC 166/2017).

Validação parcial (verificação) é um processo definido como: “demonstração, por meio de alguns parâmetros de validação, que o método analítico previamente validado tem as características necessárias para obtenção de resultados com a qualidade exigida, nas condições em que é praticado” (RDC 166/2017).

#### **3.1) Parâmetros:**

3.1.1 - Seletividade: é a capacidade de um método identificar seletivamente o analito de interesse e independente das interferências evidentes, as quais provavelmente estarão presentes; por exemplo, impurezas, componentes presentes na matriz, componentes do diluente e produtos de degradação.

Exemplo: Tempo de retenção entre amostra e padrão correspondem, indicando o mesmo princípio ativo; não exibindo nenhuma interferência no mesmo tempo de retenção.

3.1.2 - Linearidade: é a capacidade de um método obter resultados analíticos diretamente proporcionais às concentrações do analito em análise. A linearidade é definida por cálculos envolvendo as concentrações conhecidas das soluções de referência (variável independente - X) e os resultados obtidos analiticamente (variável dependente - Y), podendo ser, por exemplo, área do pico, absorvância,

volume gasto de uma solução, entre outros; construindo uma curva padrão de calibração em um software, no qual se calcula a equação da reta de regressão linear de Y em X e coeficiente de correlação. As concentrações mínima e máxima das soluções de referência devem abranger os limites especificados pelo método; devendo-se utilizar, no mínimo, cinco concentrações distintas. Segue tabela da faixa de concentração a ser utilizada para alguns ensaios, conforme RDC 166/17:

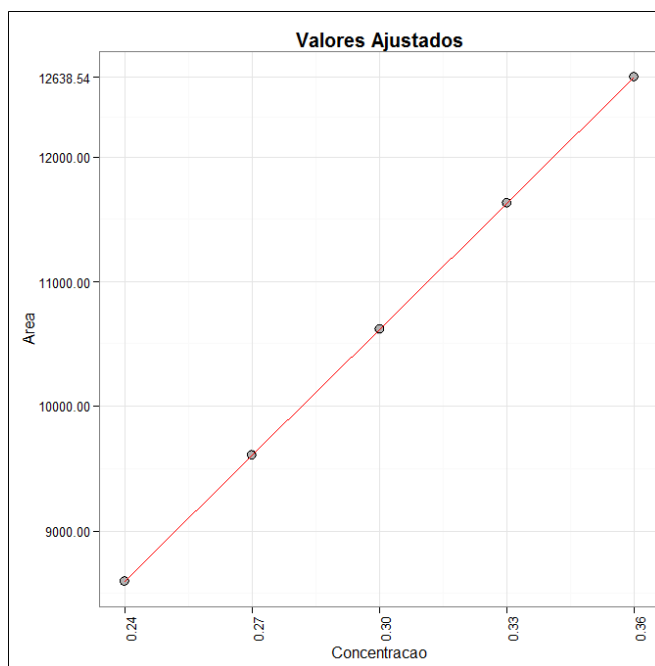
Ensaio	Alcance da Linearidade
Determinação quantitativa do analito em matérias primas ou em formas farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste.
Determinação de Impurezas	Desde o limite de quantificação até 120% da especificação.
Uniformidade de Conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste.
Ensaio de Dissolução	De $\pm 20\%$ do valor especificado para o intervalo. Caso a dissolução envolva mais de um tempo, o alcance do método deve incluir -20% sobre o menor valor e +20% sobre o maior valor.

**Tabela 1: Intervalo de Linearidade para alguns métodos analíticos.**

Exemplo: Dados da tabela a seguir obtidos experimentalmente.

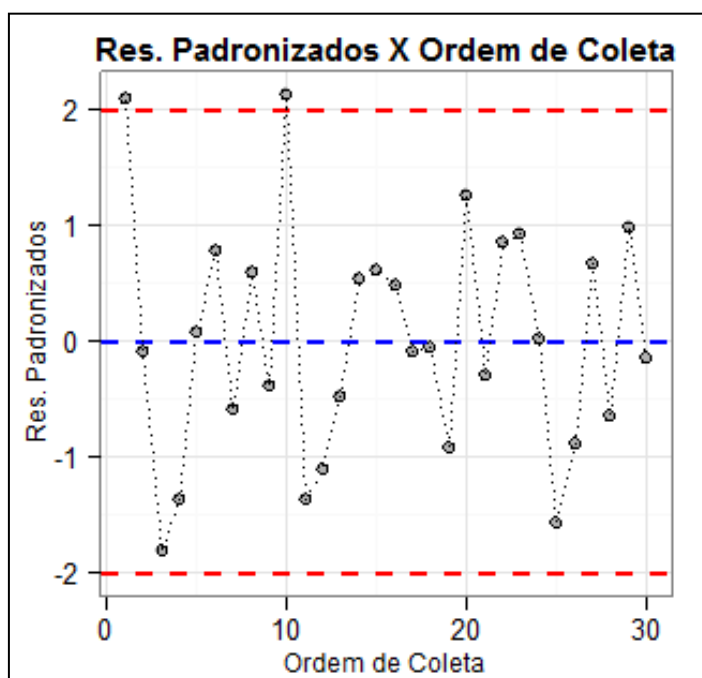
Concentração Média (mg/mL)	Área
0,24	8597,266
0,27	9607,517
0,30	10617,87
0,33	11628,18
0,36	12638,29

**Tabela 2: Exemplo de resultados obtidos experimentalmente.**



**Gráfico 1: Representação gráfica das áreas em função da concentração do analito.**

Após verificação da relação linear do gráfico, determinam-se através de software: Coeficiente de Correlação ( $r$ ), coeficiente de determinação ( $r^2$ ), coeficiente angular, equação da reta obtida e eventuais transformações matemáticas para obter a resposta linear, valor de interceptação do eixo y e gráfico de dispersão de resíduos (nível de significância  $\geq 5\%$ ).



**Gráfico 2: Gráfico de dispersão dos resíduos.**

3.1.3 - Precisão: é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos de múltiplas amostras analisadas conforme o método, com as mesmas condições. Deve ser evidenciado como desvio padrão relativo (DPR), segundo a fórmula:

$$DPR = \frac{DP}{Média} \times 100$$

Onde DP é o desvio padrão.

A precisão pode ser considerada através da repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

Repetibilidade – Precisão Intra-Corrida – expressa a precisão em um curto intervalo de tempo; utilizando as mesmas condições de análise, com um mesmo analista. Devendo-se utilizar, no mínimo, nove soluções com três concentrações distintas da substância química de referência (SQR) abrangendo os limites especificados ou seis soluções a 100% da concentração do teste.

Precisão intermediária – Precisão Inter-Corridas – expressa a precisão com variações em um mesmo laboratório, como diferentes dias, analistas, equipamentos, instrumentos; obtendo resultados semelhantes. Utilizando os mesmos parâmetros para as soluções utilizadas na repetibilidade.

Reprodutibilidade – Precisão Inter-Laboratorial - expressa a precisão com variações entre laboratórios, contudo, obtendo resultados próximos. São analisadas alíquotas de um mesmo lote por diferentes laboratórios e analistas, alterando também o ambiente, assim como equipamentos, reagente e técnicas utilizados.

3.1.4 - Exatidão: é obtido através da proximidade dos resultados de uma amostra (média dos resultados de múltiplas amostras) e o valor de referência ou valor verdadeiro. O valor verdadeiro pode ser obtido em comparação com um método validado ou método de referência. Pode ser calculada segundo a fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Resultados de concentração}}{\text{Concentração teórica calculada}} \times 100$$

A recuperação deve apresentar resultado entre 90,0% a 110,0%.

A exatidão pode ser avaliada com adição de concentração conhecida de substância química de referência (SQR) a amostra e comparando o resultado obtido com o valor verdadeiro. A escolha do procedimento para determinação da exatidão irá variar com o método analítico em estudo.

Exemplo: Concentração média obtida experimentalmente: 101,5 mg/mL;  
Concentração teórica: 100,0 mg/mL.

Recuperação (%) = 101,5%.

3.1.5 - Faixa de Trabalho/Intervalo: é o intervalo entre a menor e maior concentração do analito na amostra, esse intervalo é definido pelos resultados de linearidade, precisão e exatidão, dependendo da aplicação pretendida do método.

3.1.6 - Robustez: é a capacidade do resultado não ser afetado por pequenas e deliberadas variações nos parâmetros analíticos; segue tabela contendo os parâmetros a serem avaliados:

Preparo das Amostras	Estabilidade das soluções analíticas
	Tempo de extração
	Compatibilidade de Filtros
Espectrofotometria	Variação do pH da solução
	Diferentes lotes ou fabricantes de solventes
Cromatografia líquida	Variação do pH da fase móvel
	Variação na composição da fase móvel
	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	Temperatura
	Fluxo da fase móvel
Cromatografia Gasosa	Diferentes lotes ou fabricantes de colunas
	Temperatura
	Velocidade do gás de arraste
Outras Técnicas Analíticas	As variações a serem testadas deverão ser avaliadas criticamente e seus resultados deverão ser apresentados

**Tabela 3: Alterações para avaliação da robustez do método.** Fonte: RDC N° 166, DE 24 DE JULHO DE 2017.

Para métodos quantitativos utilizam-se os mesmos critérios de exatidão, para métodos qualitativos verifica-se se há variações no resultado analítico. Estas devem

estar dentro de um limite tolerável previamente especificado. Isso comprova a confiabilidade do método após a validação no ensaio de rotina.

Exemplo: segue um exemplo para o cálculo:

$$\text{Robustez (\%)} = \frac{ASA}{ASC} \times 100$$

ASA = área do pico da solução submetida à variação de um parâmetro

ASC = área do pico da solução controle

Considerando a alteração de +1% da composição fase móvel, ASA = 32430 e ASC = 33030.

$$\text{Robustez (\%)} = 98,18\%.$$

3.1.7 - Limite de Detecção (LOD): é a detecção qualitativa da menor quantidade de uma substância em uma amostra, mas não há, necessariamente, uma detecção quantitativa de um valor exato. A medida do limite de detecção é maior que a incerteza referida ao método. É calculada através da fórmula:

$$\text{LOD} = \frac{3,3 \times \sigma}{IC}$$

Onde IC é a inclinação da curva e  $\sigma$  é o desvio padrão.

Também pode ser medido através da intercepção com o eixo Y (no mínimo 3 calibrações), através do desvio padrão residual da linha de regressão e utilizando o ruído da linha de base de amostras de brancos. Segue exemplo de cálculo na figura 1.

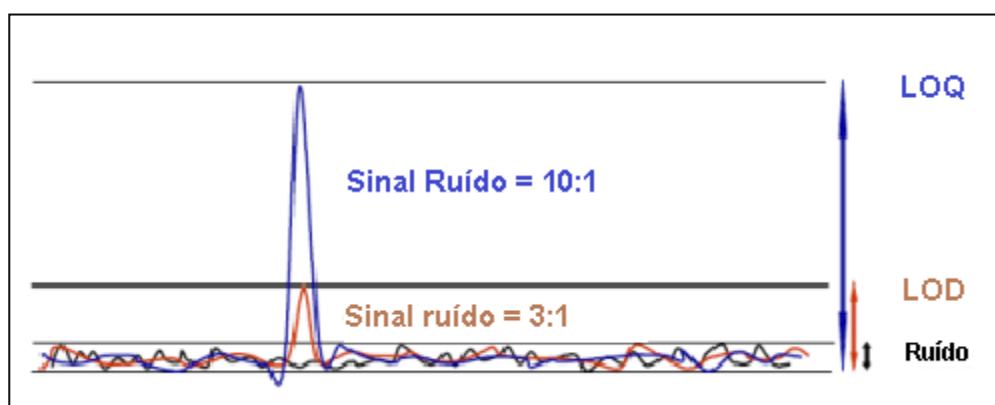
3.1.8 - Limite de Quantificação (LOQ): é a detecção quantitativa da menor quantidade de uma substância em uma amostra com precisão e exatidão. Esse parâmetro é utilizado, principalmente, em ensaios quantitativos, como impurezas ou produtos de degradação. Para realização do teste empregam-se soluções com concentrações conhecidas decrescentes até estabelecer uma concentração mínima que a substância pode ser quantificada com precisão e exatidão aceitáveis. É calculada através da fórmula:



$$LOQ = \frac{10 \times \sigma}{IC}$$

Onde IC é a inclinação da curva e  $\sigma$  é o desvio padrão.

Também pode ser medido através da interceptação com o eixo Y (no mínimo 3 calibrações), através do desvio padrão residual da linha de regressão e utilizando o ruído da linha de base de amostras de brancos. Segue exemplo de cálculo na figura 1.



**Figura 1: Exemplo para cálculo de LOD e LOQ utilizando o ruído da linha de base.**

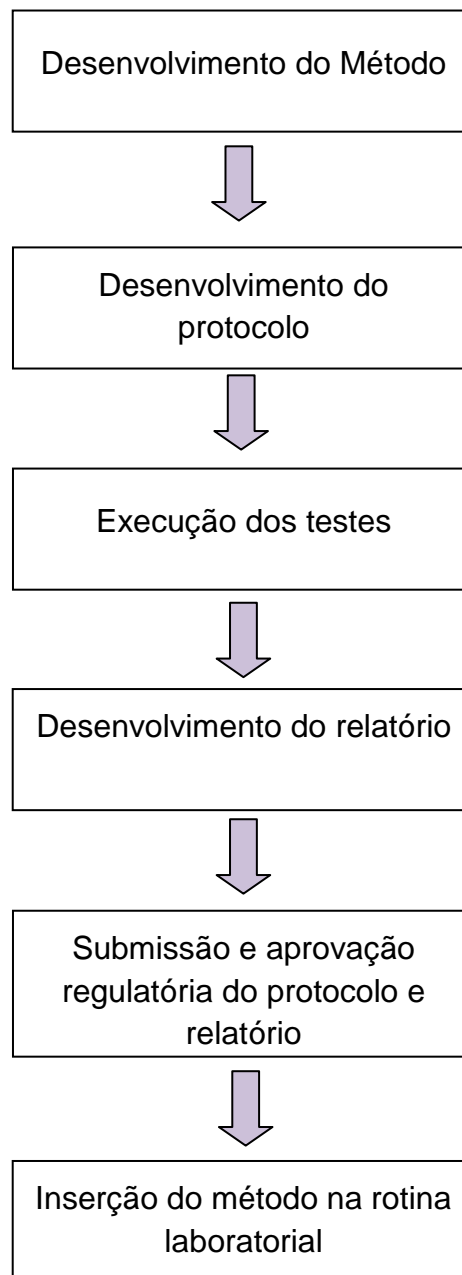
3.1.9 – Estudo de estabilidade em solução: deve ser avaliado o período de estabilidade de soluções, quando necessário, para garantir sua qualidade e eficácia.

O processo de validação analítica de métodos físico-químico envolve alguns departamentos dentro de uma organização para a conclusão satisfatória; como Assuntos Regulatórios, Garantia da Qualidade, Controle da Qualidade e Desenvolvimento Analítico.

Para validação e verificação de métodos analíticos é necessária à utilização de substância química de referência Farmacopeica (SQF) ou substância química de referência caracterizada (SQC), esta necessita de laudo analítico comprovando sua identificação, pureza, teor e potência. Todas as soluções padrões utilizadas para avaliação, que exigem replicatas, devem ser produzidas independentemente; em casos em que há diluições pode-se empregar uma solução estoque única.

É importante que os equipamentos, sistemas computadorizados e vidrarias estejam qualificados e com as calibrações dentro do prazo de validade e documentadas. As soluções e reagentes também terão que estar dentro do prazo de validade. Os analistas devem ser treinados e qualificados para realização da validação e verificação.

A validação aplica-se para métodos Analíticos, objetivando a confiabilidade dos resultados. O método deverá ser validado quando for desenvolvido por um laboratório; ou utilizado para outra finalidade, fora do escopo desenvolvido inicialmente; ou em casos de modificações do método, alterações de parâmetros; novo registro ou mudança na matriz de uma formulação ou na síntese de fabricação. Segunda a Resolução – RE N° 899, de 9 de maio de 2003, “No caso de metodologia analítica não descrita em farmacopéias ou formulários oficiais, devidamente reconhecido pela ANVISA, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados os parâmetros”. A figura 2 demonstra os processos necessários para uma validação:



**Figura 2: Fases da Validação**

O protocolo de validação deve conter as seguintes informações:

- Responsáveis pelo projeto;
- Objetivo do projeto;
- Local/planta onde a validação será conduzida;
- Tarefas de cada área e/ou cargo;

- Aprovação dos gerentes;
- Detalhamento do método, como parâmetros do equipamento, padrões, reagentes, soluções, vidrarias, etc.;
- Parâmetros e critérios selecionados para validação;
- Características de amostragem, teste e desempenho;
- Critérios de especificação.

O relatório de validação é finalizado após a realização dos métodos descritos no protocolo, este deve conter:

- Preparação e tratamento de amostras;
- Reagentes e padrões de referências com lotes e validades;
- Dados de equipamentos e vidrarias com o número de identificação;
- Todos os resultados, cálculos e estatísticas obtidos;
- Resultado dos parâmetros descritos no protocolo
- Dados relevantes.

Para desenvolver uma validação eficiente é imprescindível especificar os parâmetros de validação corretamente e seus critérios de aceitação. As escolhas devem ser fundamentadas na aplicabilidade do método e propriedades da substância em análise. A tabela 4 apresenta os parâmetros relacionados às análises:

<u>Parâmetros Avaliados</u>	Identificação	Teste de Impurezas		Doseamento (Dissolução, Uniformidade de Conteúdo e Potência)
		Quantitativo	Ensaio Limite	
Exatidão	Não	Sim	Não	Sim
Precisão - Repetibilidade	Não	Sim	Não	Sim
Precisão Intermediária	Não	Sim <sup>(1)</sup>	Não	Sim <sup>(1)</sup>
Seletividade <sup>(2)</sup>	Sim	Sim	Sim	Sim
Limite de Detecção	Não	Não <sup>(3)</sup>	Sim	Não
Limite de Quantificação	Não	Sim	Não	Não <sup>(3)</sup>
Linearidade	Não	Sim	Não	Sim
Intervalo	Não	Sim	Não	Sim

**Tabela 4: Parâmetros considerados na validação analítica.** Fonte: RDC N° 166, DE 24 DE JULHO DE 2017.

<sup>(1)</sup> Nos casos em que foi conduzida a reprodutibilidade, não é necessário conduzir a precisão intermediária.

<sup>(2)</sup> Nos casos de ensaio de identificação, pode ser necessária a combinação de dois ou mais procedimentos analíticos para atingir o nível de discriminação.

<sup>(3)</sup> Pode ser necessário em alguns casos.

Segundo a Farmacopéia Americana (USP), a robustez é considerada um parâmetro nos testes de impurezas e doseamento, no teste de identificação depende do fundamento do teste em validação.

Para métodos compendiais não são necessárias validações ou transferência analíticas, se nenhum critério for alterado. É necessário que o laboratório faça uma verificação analítica, no qual o laboratório deve comprovar o desempenho efetivo do método; deve analisar as características mais críticas do mesmo e utilizar de 1 a 3 parâmetros de avaliação para validação parcial.

É necessária a elaboração de protocolo e relatório de verificação, contendo as mesmas informações mencionadas no protocolo de validação e relatório de validação, respectivamente.

Os parâmetros recomendados para verificação analítica estão relacionados às análises na tabela 5.

<u>Teste</u>	<u>Parâmetros Recomendados</u>
Quantificação dos componentes da matriz de um produto acabado ou IFA	Precisão, Seletividade e linearidade
Determinação quantitativa de impurezas em substância medicamentosa ou produto de degradação em produto acabado	Precisão, Seletividade e Limite de Quantificação
Ensaio Limite em substância medicamentosa ou produto de degradação em produto acabado	Seletividade e Limite de Detecção

**Tabela 5: Parâmetros considerados na verificação analítica.** Fonte: USP.

Em casos de transferência de metodologia da matriz para suas subsidiárias no Brasil, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados os parâmetros de precisão, especificidade e linearidade. Cópia de toda a documentação original da validação da metodologia deverá ser anexada, para provar que a metodologia foi devidamente validada.

#### **4) Considerações finais**

Validar um método analítico é dar ao mesmo validade, credibilidade e confiança, visando diminuir ou controlar os fatores que levam a imprecisão ou inexatidão de um resultado. É um componente essencial para que um laboratório libere lotes com resultados confiáveis, por meio de estudos experimentais.

São recomendados, pela legislação brasileira e corroborado pelo ICH (International Conference on Harmonisation), parâmetros de Seletividade, Linearidade, Precisão, Exatidão, Faixa de Trabalho, Robustez, Limite de Detecção e Limite de Quantificação.

A verificação aplica-se para métodos compendiais e/ou validados, para comprovar a performance efetiva do método. São recomendados a utilização de 1 a 3 parâmetros da validação para verificação do método.

É necessária a verificação integral da adequação do sistema, instrumentos, reagentes, colunas, soluções, padrões, analistas qualificados, entre outros; para que sejam gerados resultados confiáveis.

Para finalizar o processo é necessária a aprovação de uma agência regulatória do protocolo e relatório da validação, posteriormente, o método pode ser inserido na rotina do controle de qualidade.

## REFERÊNCIAS

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Guia N° 10, de 30 de agosto de 2017. Guia para tratamento Estatístico da Validação Analítica.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Habilitação de Laboratórios Analíticos em saúde – segundo os requisitos da ISO/IEC 17025.

Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics - Guidance for Industry (July 2015).

Fajgelj et al. HARMONIZED GUIDELINES FOR SINGLELABORATORY VALIDATION OF METHODS OF ANALYSIS (IUPAC Technical Report).

ICH – International Conference on Harmonisation

Kuselman, Ilya. Validation of Test Methods, Human Errors and Measurement Uncertainty of Results - Chemistry International April-June 2017.

Resolução RDC N° 17, de 16 de abril de 2010. Dispõe sobre as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos.

Resolução RDC N° 73, de 7 de abril de 2016. Dispõe sobre mudanças pós-registro, cancelamento de registro de medicamentos com princípios ativos sintéticos e semissintéticos e dá outras providências.

Resolução RDC N° 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e da outras providencias.

Resolução RE N° 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

United States Pharmacopeia – USP 41.